

THESIS

MUNICH

1967

AUFTRENNUNG VON BLUTZELLEN
IN DER KONTINUIERLICHEN
ELEKTROPHORESE

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

Michael Ganser

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung
München
Abteilung Priv.-Doz. Dr. K. Hannig

AUFTRENNUNG VON BLUTZELLEN IN DER
KONTINUIERLICHEN ELEKTROPHORESE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von

Michael Ganser

aus

Schwenningen a. N.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Hannig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.67

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

MEINEN ELTERN!

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Hannig in der Zeit vom Mai 1965
bis September 1966 an dem Max-Planck-Institut für Eiweiß-
und Lederforschung in München durchgeführt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. K. H a n n i g
gilt für sein stets förderndes Interesse und seine wert-
vollen Anregungen während der Durchführung dieser Arbeit,
sowie für die Überlassung des Themas mein ganz besonderer
Dank.

Herrn Prof. Dr. W. G r a ß m a n n
danke ich für die Genehmigung, die Arbeit an seinen Insti-
tut auszuführen, sowie für den Arbeitsplatz.

Fräulein B. Anger danke ich für ihr großes Interesse und
ihre wertvolle Mitarbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Aufgabenstellung	8
C. Versuche und Ergebnisse	10
a) Gewinnung einer Leukocytenanreicherung	10
b) Vorversuche zur elektrophoretischen Trennung	15
c) Trennversuche und Ergebnisse mit Tris-Puffer	17
d) Trennversuche und Ergebnisse mit Phosphat-Puffer	20
e) Trennversuche und Ergebnisse mit Tris-Glycinpuffer	32
D. Prüfung auf Vitalität der isolierten Lymphocyten und Granulocyten	35
E. Morphologischer Zustand nach elektrophoretischer Trennung	38
F. Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Blutzellen	40
G. Bestimmung der Ausbeute	42
H. Experimenteller Teil	45
1. Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme	45
2. Waschen der Leukocytenanreicherung	46
3. Anfärbung der Ausstrichpräparate	46
4. Phagocytoseverfahren	46
5. Färbemethode	47

Diskussion	48
Zusammenfassung	53
Literaturverzeichnis	55
Lebenslauf	

Mit der Entwicklung der neuen Elektrophoresetechnik (TISELIUS, 1930) wurde sowohl die Biologie als auch die Medizin auf eine neue Forschungsrichtung aufmerksam, die in den darauffolgenden Jahren große Fortschritte zu verzeichnen hatte. Auf der einen Seite wurden zahlreiche Fragen der Virus- und Fermentforschung ihrer Lösung ein gutes Stück näher gebracht, auf der anderen Seite ist die elektrophoretische Analyse der Serumproteine als ein wichtiger Bestandteil der neuesten klinischen Untersuchungsmethoden nicht mehr wegzudenken. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß der Anteil der einzelnen Proteinfractionen im Serum bei vielen Erkrankungen, z.B. der Lebercirrhose, dem Nephrom und dem Myelom, sowie bei allen stark entzündlichen Prozessen sehr charakteristische Verschiebungen erfährt. Die als sogenannte Papierelektrophorese (GRASSMANN u. HANNIG, 1950) bekannt gewordene Methode wurde zu einem für die Praxis geeigneten Routineverfahren weiterentwickelt und kommt heute allgemein zur Anwendung.

Ebenso wie die löslichen Serumproteine für den Kliniker bei der Ausarbeitung der Diagnose von Interesse sind, geben ihm auch die ihm auch die geformten Elemente, seien es nun Blut- oder Gewebszellen, Auskunft über Veränderungen bei bestimmten Krankheiten. Neben der Morphologie und Anzahl

der Zellen, die im Zellausstrich zur Auswertung gelangen, interessieren ihn heute aber vor allem Veränderungen der Oberflächenladung und der Zellinhaltsstoffe.

Untersuchungen über den Aufbau von Zelloberflächen sind in den beiden letzten Jahrzehnten von vielen Arbeitsgruppen stark in den Vordergrund gerückt worden, und es konnten auch einige beachtliche Fortschritte erzielt werden. Arbeiten von FURCHGOTT und PONDER (1941) sprechen von stark sauren Phosphorsäuregruppen von Lipoiden, die die negative Überschußladung der meisten tierischen Zellen verursachen sollen. KLENK et al. (1957) konnten dann zum ersten Mal eine für die Ladung entscheidende Komponente aus verschiedenen tierischen Erythrocytenmembranen isolieren, bei der es sich um acylierte Neuraminsäuren handelt, die an spezifische Mucoproteine gebunden sind. Durch Versuche mit dem Neuraminsäure spaltenden Enzym "Neuraminidase" konnte gezeigt werden, daß auch für die Ladung sämtlicher roter und weißer Blutzellen des Menschen ausschließlich Neuraminsäuren verantwortlich sind (RUHENSTROTH-BAUER¹, 1961).

Um quantitative Aussagen über die elektrische Oberflächenladung einzeln suspendierter Zellen des Blutes oder anderer Körperorgane machen zu können, bedienen wir uns heute des Zellelektrophoreseverfahrens. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß eine Zelle infolge der Gesamtladung ihrer Oberfläche in einem elektrischen Feld wandert.

Die Geschwindigkeit dieser Bewegung ist bei einem konstanten Potentialgefälle der Größe der Oberflächenladung proportional, d.h. Veränderungen an der Oberfläche lebender Zellen werden sich in ihrer ganz spezifischen Bewegungsgröße widerspiegeln.

Obwohl schon zu Beginn des Jahrhunderts (ELLIS, 1910-11) die ersten Zellelektrophoreseversuche durchgeführt wurden, stieß die Weiterentwicklung der Methode auf erhebliche technische Schwierigkeiten. Maßgeblichen Anteil an der Entwicklung einer sogenannten analytischen Mikroelektrophoreseapparatur hat die Arbeitsgruppe um RUHENSTROTH-BAUER² (1961). Von ihm wurde eine verbesserte Apparatur angegeben, die auf ihrem heutigen Entwicklungsstand auch einer breiteren Anwendung in der klinischen Praxis zugänglich sein dürfte. Dieser Methode sind in letzter Zeit neue Anwendungsgebiete in der klinischen Diagnostik erschlossen worden: So wurden z.B. von RUHENSTROTH-BAUER³ und RUEFF (1963) bei myeloischer und lymphatischer Leukaemie und beim Hodgkin-Sarkom pathologische Abweichungen von der normalen elektrophoretischen Beweglichkeit der weißen Blutzellen gefunden. Etwas unspezifischere Veränderungen des sogenannten Hämocytopherogramms wurden in einigen Fällen von Lymphosarkomen, Erythematosen, knochenzerstörenden Prozessen und anderen schnell aufflackernden Leukocytosen beobachtet. Weitere erfolgversprechende Anwendungsmöglichkeiten liegen in der quantitativen Analyse der Antikörper-

besetzung von Zellen (SACHTLEBEN, 1965) und in der quantitativen Bestimmung der Veränderungen von Zellen durch spezifische Virusarten (STRAUB, 1965).

Nachdem mit Hilfe der analytischen Zellelektrophorese derartige Befunde erhoben werden konnten, war es von großem Interesse, Zellen mit normalen und pathologisch veränderten Membranen mittels einer präparativen Apparatur zu isolieren. Bei der daran anschließenden Untersuchung des so gewonnenen Zellmaterials handelt es sich nicht nur um die bedeutsame Frage nach der Änderung des Ladungsmusters unter Einwirkung von Enzymen, sondern auch um die Frage nach der Art der Rezeptorsubstanzen und andere immunchemische Probleme. Die mögliche Isolierung abgespaltener Ladungsträger in größeren Mengen würde ihre nähere chemische Charakterisierung wesentlich erleichtern.

In Bezug auf diesen Problemkreis interessiert den Mediziner natürlich vor allem das Blut, als Suspension verschiedener geformter Anteile im Serum. Die Erythrocyten sind, physiologisch bedingt, sehr einfach in ausreichend reiner Form zu gewinnen; bei den Leukocyten ist die Isolierung im Vergleich sehr viel schwerer. Nach THIMM (1964) kann man die bisherigen Methoden zur Anreicherung bzw. Isolierung weißer Blutzellen folgendermaßen einteilen:

1. Sedimentierungsverfahren

a) beschleunigtes Sedimentieren mit makromole-

kularen Stoffen wie Dextran, Kollidon usw.

b) Zwei- und Mehrschichtensedimentierung

2. Zentrifugiermethoden

a) Durchlaufzentrifuge nach COHN - TULLIS -
SURGENOR (1951)

b) Gegenstromzentrifuge nach LINDAHL (1956)

3. Hämolyseverfahren

a) Säure-Hämolyse nach SZILARD (1926)

b) Ammoniumchlorid-Hämolyse nach EGE - NAGEL -
LAHANN (1922)

c) Wasser-Hämolyse nach BEHRENS - ESCH (1963)

4. Anreicherung in Exsudaten

a) Schaumanreicherung nach DITTMER - DOST -
RIND (1960).

So wie bei oben angeführten Methoden auf der einen Seite spezifisches Gewicht, auf der anderen Seite unterschiedliche osmotische Resistenz der einzelnen Blutzellen ausgenutzt werden. liegt es nahe, auch eine weitere konstante Eigenschaft dieser Zellen zu ihrer Isolierung in Anwendung zu bringen, nämlich ihre elektrische Oberflächenladung.

Jede Zellart des Blutes eines gesunden Menschen besitzt eine ihr eigene bestimmte elektrophoretische Beweglichkeit, die nur wenig von der Norm abweicht. Aufgrund dieser Tatsache müßte es nun möglich sein, mit Hilfe einer präparativen, kontinuierlich arbeitenden Elektrophoreseapparatur

Blutzellen in Erythrocyten, Lymphocyten und Granulocyten aufzutrennen.

Bei der von HANNIG (1964) entwickelten Methode der trägerfreien Elektrophorese handelt es sich um folgendes Prinzip:

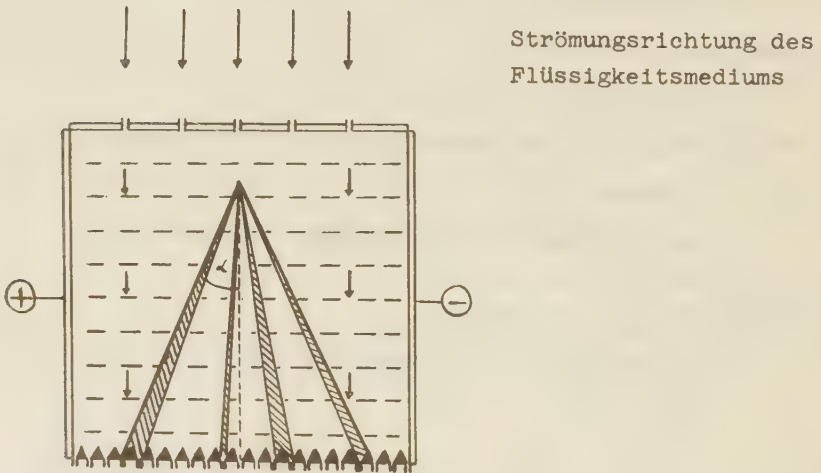


Abb. 1: Prinzip der Ablenkungselektrophorese

Zwischen zwei, in einem Abstand von 0,5 mm angeordneten Glasplatten, strömt eine Elektrolytlösung von geeignetem pH-Wert. Quer dazu laufen die Kraftlinien eines elektrischen Feldes. Durch Öffnungen am oberen Rand der vorderen Glasplatte kann wahlweise das zu trennende Substanzgemisch kontinuierlich zugeführt werden, sodaß Komponenten mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit in

verschiedene Richtungen abgelenkt werden und nach Verlassen der Anordnung mittels einer Schlauchpumpe an verschiedenen Stellen entnommen werden können.

Die Strömungsgeschwindigkeit sowie die Feldstärke sind in weiten Grenzen experimentell variierbar, daher kann grundsätzlich jeder gewünschte Ablenkungswinkel eingestellt werden. Die Größe des Ablenkungswinkels, mit $\text{tg } \alpha$ bezeichnet, ergibt sich aus dem Verhältnis:

$$\text{tg } \alpha = \frac{\text{elektrophoretische Wandergeschwindigkeit (v)}}{\text{Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung (w)}} \quad (1)$$

Nach den allgemein gültigen Gesetzen der elektrophoretischen Wanderung ist die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (v) eines Stoffes proportional dem Strom i sowie der Beweglichkeit u und umgekehrt proportional dem effektiven Querschnitt der Elektrophoresekammer sowie der spezifischen Leitfähigkeit des Puffers.

$$v = \frac{u \cdot i}{q \cdot k} \quad (2)$$

Setzt man v in die Gleichung (1) für tg ein, ergibt sich für den Ablenkungswinkel:

$$\text{tg } \alpha = \frac{u \cdot i}{q \cdot k \cdot w} \quad (3)$$

v = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit in cm/sec
 u = elektrophoretische Beweglichkeit des Teilchen cm/V
 i = Strom in A
 q = Querschnitt der Kamera in cm^2
 k = spez. Leitfähigkeit in $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
 w = Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung in cm/sec

Mit dieser Gleichung ist es dann möglich, bei Kenntnis der elektrophoretischen Beweglichkeit der zu trennenden Stoffe auch die geeigneten Versuchsbedingungen zu wählen und vorherzubestimmen, an welcher Stelle die Komponenten die Apparatur verlassen werden.

Bei der Apparaturanordnung zur Trennung von Organellen und ganzen Zellen steht die Trennkammer vertikal, damit die Sedimentation grobdisperser Teilchen in Richtung der Pufferströmung erfolgt. Diese Anordnung setzt eine absolut gleichmäßige Temperaturverteilung im Pufferfilm voraus, um Thermokonvektion zu vermeiden und laminare Strömungsverhältnisse zu gewährleisten. Durch den Stromfluß im Pufferfilm entstehende Joule'sche Wärme wird mittels Kühlbatterien, die nach dem Peltier-Effekt arbeiten, vernichtet. Durch Verwendung dieses Kühlsystems ist es auch möglich, die Temperatur während des Trennvorgangs konstant in niedrigen Bereichen zu halten. Mit Hilfe dieser Methode war es bisher gelungen, vitale Tumorzellen (HANNIG, 1964) zu isolieren und tierische und pflanzliche Zellorganellen von einander zu trennen.

B.

Aufgabenstellung

Die bis heute veröffentlichten Verfahren zur Isolierung und Trennung der Leukocyten untereinander dienen hauptsächlich dem Zweck nachfolgender chemischer und physiologischer Untersuchungen, d.h. es wird besonderer Wert auf Reindarstellung und Erhaltung von Morphologie und Vitalität der Zellen gelegt. Diesen Anforderungen aber konnten die bisherigen Methoden nur mit großen Einschränkungen gerecht werden.

Es steht fest, daß die elektrophoretische Arbeitsweise ein schonenderes Verfahren darstellt, als die Zentrifugation, bei der durch die nötigen hohen Schwerdefelder die Kräfte, die auf die empfindlichen Zellen wirken, größer sind als bei der Elektrophorese, wo bereits schwache elektrostatische Kräfte eine Wanderung bewirken.

Zellen gleicher Art bzw. gleichen Ursprungs haben oft sehr unterschiedliche Größe und Gewicht und sedimentieren deshalb auch uneinheitlich (PEACH u. TRACEY, 1956). Die elektrische Ladung der Blutzellen z.B. ist dagegen nach bisherigen Erfahrungen weitgehend konstant und nur von geringer Streuung am Material gleicher Individuen (RUHENSTROTH-BAUER u. PIPER, 1956).

Meine Aufgabe in vorliegender Arbeit war es, die trägerfreie kontinuierliche Ablenkungselektrophorese auf die Trennung weißer Blutzellen im präparativen Maßstab anzuwenden. Daraus ergeben sich zwangsläufig drei Problemkreise:

1. Es soll eine möglichst schonende Methode zur Aufarbeitung von Blutzellen gefunden und ihr Einfluß auf die nachfolgende elektrophoretische Trennung geprüft werden.
2. Anhand einiger vergleichender Trennversuche sollen optimale Milieubedingungen herausgefunden werden. Dabei werden hauptsächlich Anforderungen an den pH-Wert und

an die Osmolarität der Puffersysteme gestellt, d.h. es soll eine möglichst große Annäherung an physiologische Bedingungen gefunden werden.

3. Durch Anfertigen von Ausstrichpräparaten sollen die Versuche ausgewertet werden und die Zellen durch Stärkephagocytose sowie färberisches Verhalten auf ihre Vitalität getestet werden.

C. Versuche und Ergebnisse

a) Gewinnung einer Leukocytenanreicherung.

Zur Frage optimaler Versuchsbedingungen bei der Aufarbeitung von Blutzellen kann man sich zum Teil auf Erfahrungen beziehen, die im Zusammenhang mit der analytischen Mikroelektrophoreseapparatur nach Ruhenstroth-Bauer gemacht worden sind. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen hat sich dabei herausgestellt, daß auf die schonende Vorbehandlung der Zellen größter Wert zu legen ist.

Als Ausgangsmaterial wurde im allgemeinen eine 100 ml Frischkonserve Blut beliebiger Blutgruppe verwandt, die den normalen Anteil an ACD-Stabilisator enthielt. Eine Ungereinbarmachung des frisch abgenommenen Venenblutes mit EDTA (Titriplex III der Firma Merck) brachte im Hinblick auf die elektrophoretische Trennung keine besseren Er-

gebnisse und wurde deshalb fallengelassen.

Prinzipiell ist die Anreicherung weißer Blutzellen nicht sehr schwer. Läßt man Blut in geeigneten, englumigen Röhrchen sedimentieren (60 Min. unter einem Winkel von 45° , 15 Min. unter einem von 90°), so erhält man einen "Teppich" (buffy-coat) weißer Blutzellen, die sich infolge leichteren spezifischen Gewichtes direkt über den Erythrocyten absetzen. Nach allgemeinen Überlegungen kann sich aber in dem Überstand mit der buffy-coat je nach Senkungsaktivität nur etwa 50% oder weniger der vorhandenen weißen Blutzellen befinden; der restliche Prozentsatz ist im Erythrocytensediment begraben. Dieser zuweilen sehr niedrige Anteil ließe sich ohne weiteres durch Zugabe makromolekularer Stoffe wie Dextran, Kollidon usw. noch um 20 - 30% erhöhen, wenn nicht, wie in unserem Fall, ein Punkt besonderer Prüfung verlangt.

Bei anderen Methoden zur Anreicherung von Leukocyten wie z.B. Zentrifugation und Dichtegradientenverfahren spielen besonders die Größen- und Dichteverhältnisse eine Rolle. In der Zellelektrophorese dagegen sind vor allem die elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschiede der einzelnen Zellarten gegenüber dem Puffermilieu von Bedeutung und es muß größte Sorgfalt darauf verwandt werden, daß die spezifischen Ladungsträger chemisch und physikalisch unverändert zur Wirkung kommen.

In letzter Zeit wurde bei Zusatz von Dextran zur Sedimentierungsbeschleunigung die Freisetzung einer cytolisierenden Substanz aus den Leukocyten beschrieben (FISCHER et al. 1963). Die damit einhergehende Verklumpung der Zellen hat sicherlich auch eine erhebliche Membranschädigung zur Folge. Wie ich selbst feststellen konnte, resultiert daraus neben der veränderten Morphologie auch eine deutliche Veränderung in bezug auf die Beweglichkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen.

Auf Grund dieser Erfahrungen untersuchte ich deshalb Zusätze von Polyvinylpyrrolidon (Luviskol BASF, MG 38000) und nach einem anderen Vorschlag (ENGELHARDT, 1964) EDTA (Titriplex II der Firma Merck) zur Beschleunigung der Senkung. Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse bei einem Ausgangsmaterial von 24 ml Citratblut pro Ansatz.

Tabelle 1: Senkungsbeschleunigung durch verschiedene Zusätze.

Zusatz	Relation zum Blut	Überstand nach Schrägsenkung
I PVP 3% in physiol.NaCl	1 : 4	7 ml
II PVP 6% in physiol.NaCl	1 : 4	13,5 ml
III EDTA 0,115 m	1 : 10	3 ml
IV Blut ohne Zusatz		2,5 ml

Bei der Zugabe von 6% Luviskol in physiologischer NaCl zeigte sich schon makroskopisch eine Agglomeration der Erythrocyten; der mikroskopische Befund im Ausstrich- und Nativpräparat konnte das weitgehend bestätigen. Dagegen waren bei Versuchsansatz I mit 3% Luviskollösung keine wesentlichen morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Originalblut festzustellen.

Im weiteren Verlauf der Aufarbeitung wurde der so erhaltene Überstand an Blutplasma und darin aufgeschlemmten Erythrocyten und Leukocyten sorgfältig mit einer kleinen als Saugpumpe verwendeten Schlauchpumpe abgenommen, auf vier silikonisierte 10 ml Zentrifugengläschen verteilt und mit physiologischer Kochsalzlösung vom pH 7,2 im Verhältnis 1 Teil Überstand : 1 Teil Kochsalzlösung gut gemischt. Die Zellsuspension wurde bei 800 UPM $\hat{=}$ 71 g (EHRHARDT et al., 1964) 15 maximal 20 Min. in der Christzentrifuge bei 4° zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgehebert und durch jeweils gleiche Teile physiologischer Kochsalzlösung ersetzt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und damit, wie in Vorversuchen festgestellt werden konnte, weitgehend störendes, adsorbiertes Protein von der Oberfläche der Zellen entfernt. Weiteres Waschen, zum Zwecke einer besseren elektrophoretischen Beweglichkeit bringt keine Vorteile mit sich (PIPER et al., 1956).

Das auf diese Art und Weise erhaltene Sediment an Blut-

zellen wurde in Kammerpufferlösung aufgenommen und in der Thoma-Zählkammer ausgezählt: in der Regel erhielt ich ein Verhältnis von roten zu weißen Blutzellen wie 2 bis 3 : 1. Von der Anreicherung wurde jeweils ein Ausstrich und ein Nativpräparat angefertigt und sofort ausgewertet. Bei normalem histologischen Befund und gutem morphologischen Zustand folgte anschließend sofort die elektrophoretische Trennung.

Abb. 2 zeigt die beiden Extinktionskurven, die in einem zweistündigen Lauf (vgl. Abschnitt C) erhalten wurden. Die Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit zwischen Erythrocyten und Leukocyten mit und ohne Zusatz von Luviskol zur Beschleunigung der Sedimentation waren minimal. Dieses Ergebnis und die angefertigten Ausstrichpräparate der einzelnen Fraktionen ließen den Schluß zu, daß die durch Zusatz von 3% Luviskol zur Beschleunigung der Senkung erhaltenen Zellen weder in ihrer Morphologie noch in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit wesentlich beeinflußt werden. Damit wurde für die weiteren Versuche eine weitgehende Unabhängigkeit von der stark unterschiedlichen Senkungsaktivität der verschiedenen Ausgangsmaterialien erreicht.

Zuführung der Trennlösung →

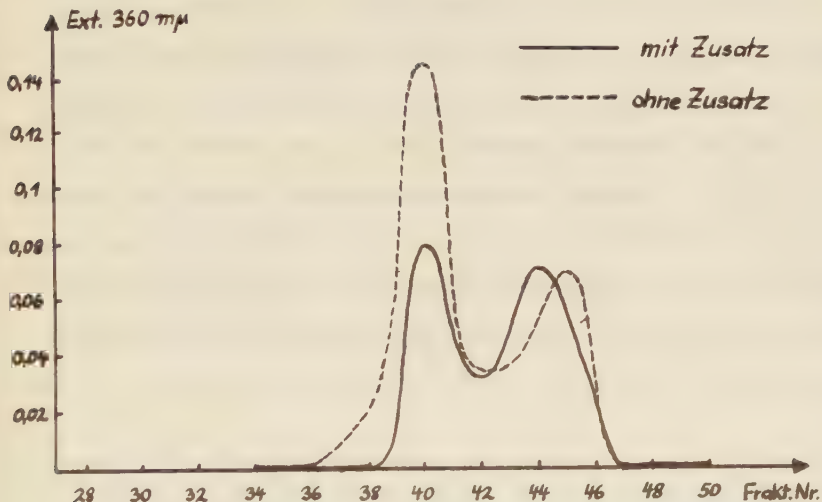


Abb. 2: Versuch zur Feststellung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Blutzellen mit und ohne Zusatz von 3% Luviskol zur beschleunigten Sedimentation.

Versuchsbedingungen: Tris-Glycinpuffer

$$\kappa = 0,0015 \Omega^{-1}, \text{ cm}^{-1}$$

2000 V, 130 mA,

50° C, 130 ml/h $\hat{=}$ 55 min/45 cm

Konz.: 30 Mill.Z./ml Ery:Leuko. 5:1

Konz.: 30 Mill.Z./ml Ery:Leuko. 2:1

b) Vorversuche zur elektrophoretischen Trennung.

Bei der Suche nach optimalen Milieubedingungen konnte ich mich auf einige Erfahrungen stützen, die mit der analytischen Zellelektrophorese gemacht worden waren, aber in einigen wesentlichen Punkten bestehen doch, von seiten der

präparativen Methode her, erhebliche Unterschiede.

So ist z.B. der osmotische Druck des betreffenden Puffermediums sehr stark von seiner Ionenkonzentration abhängig. Wenn schon unter Rücksichtnahme auf physiologische Bedingungen gewisse Grenzen gesetzt sind, so gelangte ich darüberhinaus in einigen Vorversuchen zu dem Ergebnis, daß eine Erhöhung der Ionenkonzentration, natürlich in physiologischen Bereichen, eine Abnahme der elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschiede der verschiedenen Zellarten mit sich bringt.

Nach einer Theorie von MAHLIG (1964) läßt sich das folgendermaßen erklären: Für die Abhängigkeit der Beweglichkeit u eines wandernden Teilchens von der Ionenstärke μ der Lösung gilt nämlich bei nicht zu großer Änderung der Ionenstärke die Formel:

$$u_1 : u_2 = \mu_2^{1/2} : \mu_1^{1/2}$$

Verantwortlich für die durch den "Salzeffekt" (WIEDEMANN, 1935) verursachte Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen ist die Ausbildung eines elektrokinetischen Potentials entgegengesetzten Vorzeichens an der Grenze der Zelle zur umgebenden Lösungsmittelschicht. Die durch diese "Ionenwolke" bedingte Zunahme des Zelldurchmessers bringt in dem reibenden Milieu zwangsläufig eine bremsende Wirkung auf die elektrophoretische Beweglichkeit mit sich.

Abgesehen davon bedeutet eine Erhöhung der Ionenkonzentration eine wesentliche Mehranforderung an das Kühlsystem der Apparatur wegen der Beseitigung der anfallenden Joule'schen

Wärme. Diese ist auf der einen Seite bei konstanter Feldstärke proportional dem Produkt aus Ionenladung, Ionenbeweglichkeit und Ionenkonzentration, summiert über sämtliche am Stromtransport beteiligte Ionen, auf der anderen Seite proportional dem Quadrat der Feldstärke.

Weiterhin muß im Gegensatz zur analytischen Mikromethode bei der präparativen Zellelektrophorese ein Milieu gefunden werden, das auch bei einer Versuchsdauer von maximal 12 Stunden die Erhaltung der Vitalität sichert und damit eine Dialyse von Zellinhaltsstoffen weitgehend verhindert.

Bei der Beschreibung der Trennversuche verzichte ich hier auf die chronologische Reihenfolge und führe die Ergebnisse und Beobachtungen unter den verschiedenen Milieubedingungen nacheinander an.

c) Trennversuche und Ergebnisse mit Tris-Puffer.

In einigen vorausgehenden, orientierenden Versuchen wurden zunächst Verdünnungsreihen einer bestimmten Tris-Pufferlösung hergestellt, mit Zitronensäure auf pH 7,2 eingestellt und anhand von Nativpräparaten und eventuell erfolgter Hämolyse nach 24 Stunden die physiologisch beste Konzentration ermittelt. Diese lag bei 17,5 g Tris pro Liter. Um Veränderungen der Elektrolytzusammensetzung und des pH-Wertes während des Versuches in der Trennkammer zu vermeiden, hat sich eine Ionenstärke der Pufferlösung von

$\mu = 0,03 - 0,05$ als geeignet und sehr zweckmäßig erwiesen. Das entspricht einer spezifischen Leitfähigkeit von $0,001 - 0,0025 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (HANNIG, 1964).

Dieser Tatsache Rechnung tragend, verdünnte ich die Tris-stammlösung von $17,5 \text{ g/l}$ zunächst mit isotonischer Glucoselösung auf $4,4 - 2,2 \text{ g Tris pro Liter}$. Höchstmöglicher und niedrigster Wert wurden durch oben beschriebene Methode bezüglich der spezifischen Leitfähigkeit bestimmt. Mit den an Konzentration verschiedenen Tris-Pufferlösungen wurden nach folgender Methode eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um den Einfluß verschiedener Faktoren auf das Ergebnis der Trennung klar herauszustellen. Die Trennkammer wurde mit Pufferlösung gefüllt, und die Apparatur zur Stabilisierung der gewünschten Versuchsbedingungen eine halbe bis dreiviertel Stunde vor der eigentlichen Trennung eingeschaltet. Dies hat sich vor allem bei beabsichtigten kurz aufeinanderfolgenden Versuchen mit verschiedenen Pufferlösungen bewährt; man kann sich dadurch einige Arbeit und was viel wichtiger ist, wertvolles Ausgangsmaterial sparen.

Das, in vorbereitenden Arbeiten gewonnene Ausgangsmaterial wurde mit Kammerpufferlösung auf eine Konzentration zwischen $15 - 40 \text{ Millionen Zellen /ml}$ verdünnt und mit einer Geschwindigkeit von $0,6 - 2 \text{ ml/h}$ je nach Konzentration dosiert. Bei der Dosierung ist besonders auf geringe Bandbreite der

abgelenkten Suspension sowie auf gleichmäßiges Einströmen des Zellmaterials in die Trennkammer zu achten. Es muß ein für jeden Versuch verschiedenes, optimales Verhältnis zwischen der Menge der eingespritzten Substanz und des durchströmenden Puffers gefunden werden.

Während der elektrophoretischen Trennung wurde die Zellsuspension mit Eis gekühlt, einmal um den Stoffwechsel der Zellen auf ein Minimum zu beschränken, zum zweiten, um sie nicht plötzlichen, großen Temperaturunterschieden auszusetzen. Die Pufferfilmtemperatur wurde auf 5° gehalten, ebenso die 50 Gläschen zur Aufnahme der einzelnen Fraktionen.

Mit dem verwendeten Trispuffer von pH 7,2 ließen sich Feldstärken von 45 - 50 Volt/cm erreichen. Eine Verteilungskurve nach Trübungsmessung der elektrophoretisch erhaltenen Fraktionen ist in Abb. 2 dargestellt. Die Versuchsbedingungen waren: Trispuffer pH 7,2; 2300 Volt, 130 mA; 7,5° im Pufferfilm, Pufferdurchlaufgeschwindigkeit: 60 min/45 cm; Abstand 1 cm der Entnahmeöffnungen. Dosierte wurden 2 ml/h einer Anreicherung der Konzentration von 15 Millionen Zellen /ml. Das Verhältnis von Leukocyten zu Erythrocyten betrug 1:3. Nachdem einige einigermaßen zufriedenstellende Auftrennungen durchgeführt worden waren, wurden die Versuchsbedingungen hinsichtlich der Feldstärke, Pufferflußgeschwindigkeit und Ionenkonzentration variiert. Die Er-

gebnisse unterschieden sich in Bezug auf Trennung und Morphologie der Zellen nicht wesentlich.

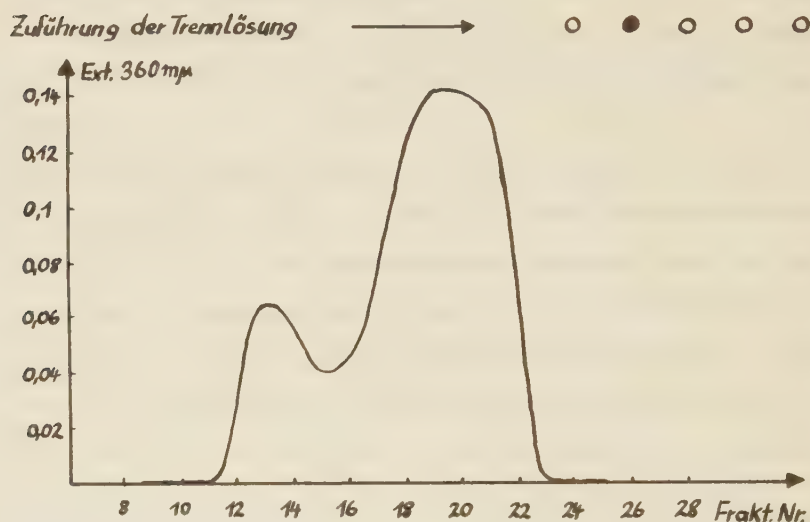


Abb. 3: Versuch zur Trennung von Blutzellen mit Tris-puffer.

Trispuffer pH 7,2; (8,75 g Tris pro 0,5 l H_2O , mit 2 m Zitronensäure auf pH 7,2 eingestellt und mit 5% isoton. Glucoselösung auf 2,5 l aufgefüllt); spezif. Leitfähigkeit $\kappa = 0,0013$, 2.300 Volt, 130 mA; Durchlaufgeschwindigkeit 70 ml/h; Dosierung: 2 ml/h einer Anreicherung von 15 Mill. Z./ml. Abstand der Entnahmevorrichtung 1 cm.

d) Trennversuche mit Phosphat-Puffer nach Sörensen.

Nach der in den Vorversuchen mit Tris-Puffer beschriebenen Methode wurde gleichfalls die physiologische Konzentration eines Phosphatpuffers vom pH 7,2 ermittelt. Zur

Erreichung einer brauchbaren spezifischen Leitfähigkeit wurde zunächst wieder mit isotonischer Glucoselösung verdünnt. Mit diesem Puffer ließen sich die gleichen Versuchsbedingungen erreichen wie mit Tris-Puffer.

Abb. 4 gibt die durch Trübungsmessung erhaltene Verteilungskurve wieder.

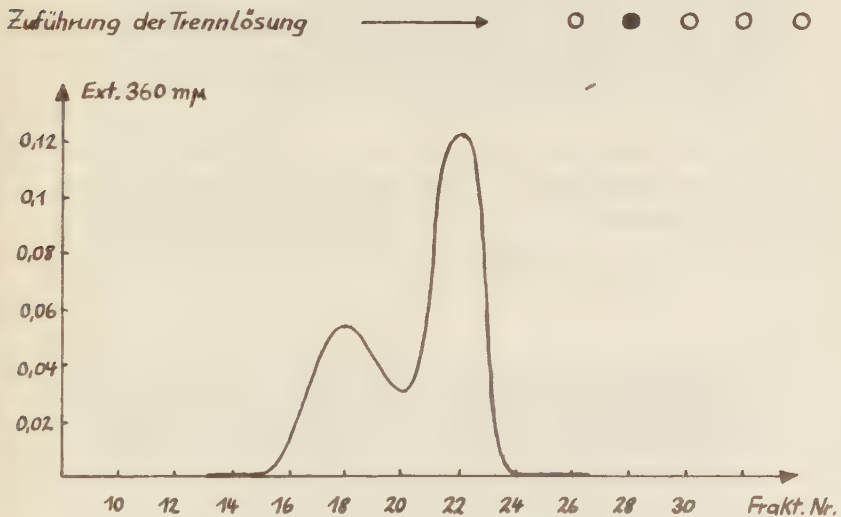


Abb. 4: Versuch zur Trennung von Blutzellen mit Phosphatpuffer.

Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,2 (Phosphatpuffer-Stamm-lösung 0,5 l mit 5% isotonischer Glucoselösung auf 3 l aufgefüllt); 2.400 Volt 130 mA; Durchlaufgeschwindigkeit 75 ml/h cm; Dosierung 1,5 ml/h einer Anreicherung von 20 Mill. Z./ml; Leuko : Ery = 1 : 2; spezif. Leitfähigkeit: Phosphat 1 + 5 = $0,00147 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Abstand 1 cm der Entnahmeöffnungen.

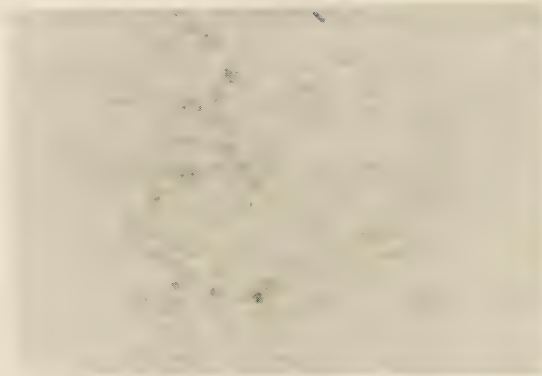


Abb. 4a: Bei der Aufnahme handelt es sich um die Zellfraktion aus Gläschen 18 der Abb. Nr.4. Die Erythrocyten konnten, wie zu sehen ist, weitgehend abgetrennt werden. Vergrößerung: 400 : 1.

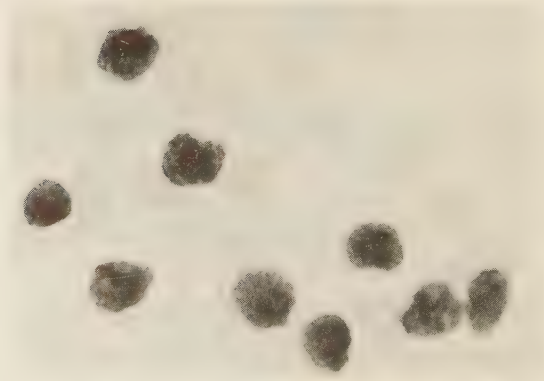


Abb. 4b: In der Fraktion 19 finden sich Erythrocyten und Lymphocyten im Verhältnis von etwa 1:1.
Vergrößerung: 800 : 1.

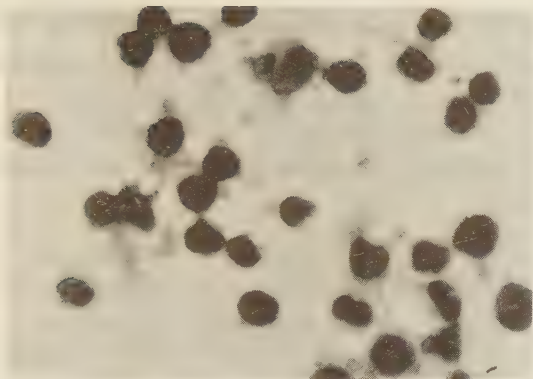


Abb. 4c: In Gläschen 20 zwischen Erythrocyten- und Granulocytenfraktion erfahren die Lymphocyten eine gewisse Anreicherung. Bei den Granula dürfte es sich um Thrombocyten handeln. Vergrößerung: 800 : 1.

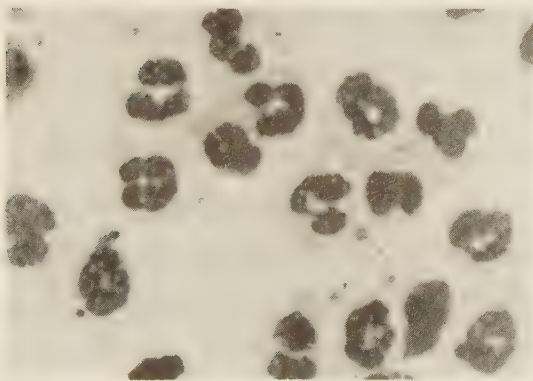


Abb. 4d: Diese Aufnahme entspricht der Granulocytenfraktion in Gläschen 22. Das Zellplasma ist stark aufgeloockert, die Zellen insgesamt leicht gequollen. (Siehe dazu auch Abschnitt E) Vergrößerung: 800 : 1.

Unabhängig von verschiedenen Versuchsbedingungen in bezug auf Feldstärke, Pufferdurchlaufgeschwindigkeit und Konzentration der Anreicherung in bestimmten Grenzen (15 - 40 Mill. Z./ml) trat in beiden Puffersystemen immer wieder ein Vorgang störend in Erscheinung, nämlich die Agglutination: Die Zellen flockten kurz nach Eintritt in die Trennkammer als weißer Niederschlag aus und sedimentierten sehr rasch ohne größere Ablenkung.

Es wurde deshalb versucht durch Änderungen des Milieus Versuchsbedingungen zu finden, bei denen Agglutination während der elektrophoretischen Trennung vermieden werden konnte. Nach MOORE und LYANS (1963) handelt es sich dabei um Komplexbildungen, die zur Verklumpung und natürlich dadurch zu Schädigungen der Zellmembranen führen. Bei fast allen unseren nachfolgenden Versuchen hat sich deshalb ein geringer Zusatz von Äthylendiamintetraacetat (EDTA) zum Kammerpuffer zur Vermeidung der Agglutinationserscheinungen bewährt. Ausnahmen davon waren immer wieder einmal zu beobachten. Neben bis heute völlig unbekannten Faktoren werden dafür vor allem unterschiedliche Eiweißzusammensetzungen des Plasmas und das Verhalten der Blutplättchen nach fettreicher Nahrungsaufnahme verantwortlich gemacht (BÖHL, 1965).

Die Ergebnisse mit beiden vorher besprochenen Puffern (Tris und Phosphat) waren auch mit Zusatz von EDTA gut reproduzierbar. Nach Beurteilung der einzelnen Fraktionen, zunächst im Nativpräparat später im Ausstrich, waren keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. In allen Versuchen aber waren die Übergänge zwischen den verschiedenen Zellarten fließend, d.h. Überschneidungen der Fraktionen vor allem zwischen Erythrocyten und Lymphocyten waren nicht zu vermeiden.

Der Grund dürfte darin zu suchen sein, daß vor allem die relativ schweren Erythrocyten in dem Puffermilieu in den Bereich der Lymphocyten hineinsedimentieren. Zur Vermeidung der raschen Sedimentation der Zellen in dem Medium wurde versucht statt Glucose eine spezifisch schwerere Lösung zu verwenden.

Das durchschnittliche spezifische Gewicht der Blutzellen beträgt nach GRABAR (1955) etwa $d = 1066$. Durch Verwendung einer isotonischen Rohrzuckerlösung gelang es ein Puffermilieu mit dem spezifischen Gewicht $d = 1035$ herzustellen, gegenüber $d = 1025$ eines Puffers der mit Glucoselösung verdünnt worden war.

In wieweit die gewünschten Verbesserungen erreicht werden konnten, zeigt folgender Versuch: Verwendet wurde Phosphatpuffer vom pH 7,2 mit einem Zusatz von 0,93 g EDTA/l. Bei einer Spannung von 2 700 Volt und einer Stromstärke von 120 mA betrug die Pufferfilmtemperatur 6° . Die Dosierung hielt sich mit 0,8 ml/h bei einer Konzentration von 25 Mill. Z./ml an oben angeführte Bedingungen. Die Pufferdurchlaufgeschwindigkeit von 100 ml/h war etwas schneller als in vorangegangenen Versuchen. Abb. 5 gibt die Werte nach Trübungsmessung wieder; zur besseren Trennschärfe wurde eine Entnahmeleiste verwendet, die im Abstand von je 0,5 cm eine Entnahmevorrichtung enthielt.

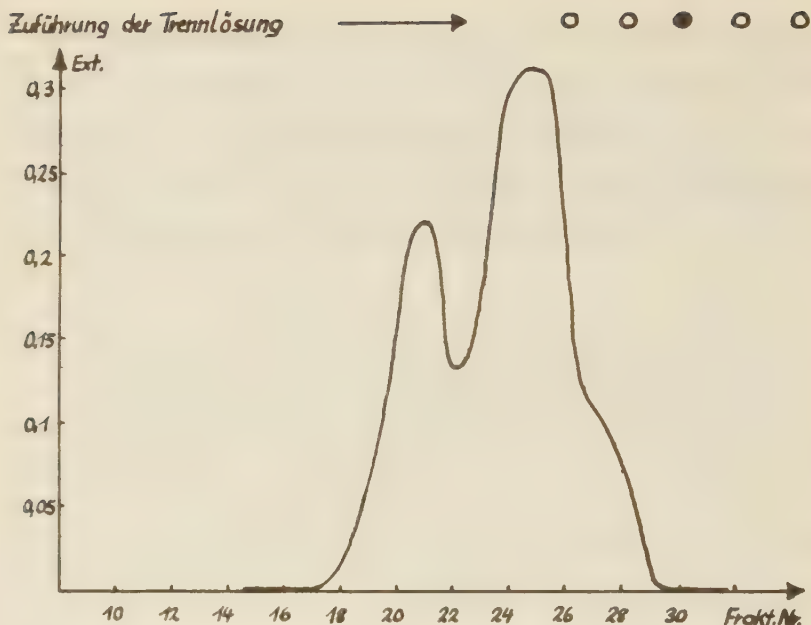


Abb. 5: Versuch zur Trennung von Blutzellen in Phosphatpuffer.

Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,2 (Phosphat-Stammlösung 0,5 l mit 10% isoton. Rohruckerlösung auf 3,5 l aufgefüllt); 2 700 Volt 120 mA; Durchlaufgeschwindigkeit 65 min/45 cm; Dosierung 0,8 ml/h einer Anreicherung von 25 Mill. Z./ml; Leuko : Ery = 3 : 2; spezif. Leitfähigkeit: $\kappa = 0,0015 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; Puffertemperatur 6° ; Abstand 0,5 cm der Entnahmeöffnungen.

Die Abbildungen 5 a - g zeigen die erhaltenen Fraktionen der Reihe nach:

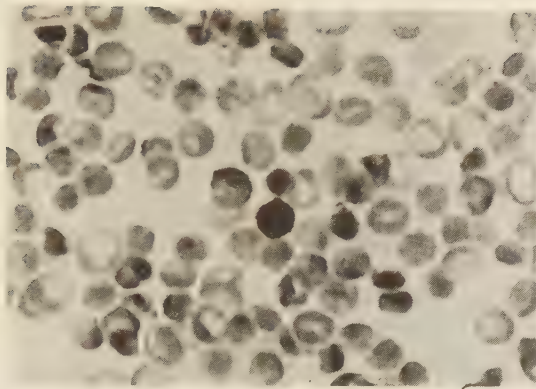


Abb. 5a: Erythrocytenfraktion aus Gläschen 21 mit vereinzelt kleinen Lymphocyten. Vergrößerung: 800 : 1.

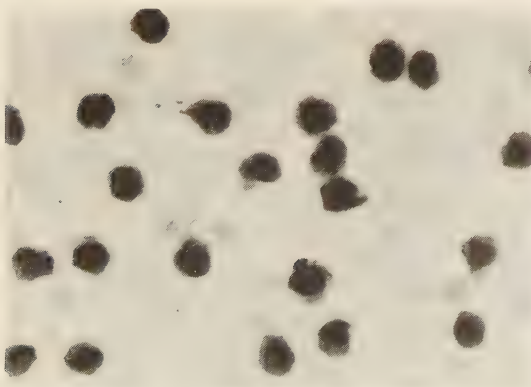


Abb. 5b: Im absteigenden Schenkel des Erythrocytenpeaks (Gläschen 22) mischen sich Erythrocyten und Lymphocyten im Verhältnis von etwa 4:1.
Vergrößerung: 800 : 1.

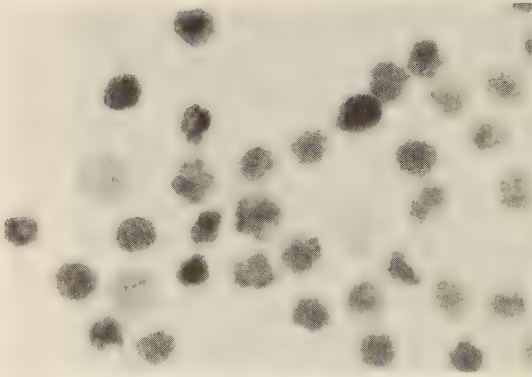


Abb. 5c: Im Bereich zwischen Erythrocyten- und Granulocytenpeak (Gläschen 23) finden sich vorwiegend lymphocytäre Formen, neben einigen, stärker abge-
lenkten Granulocyten. Vergrößerung: 800 : 1.

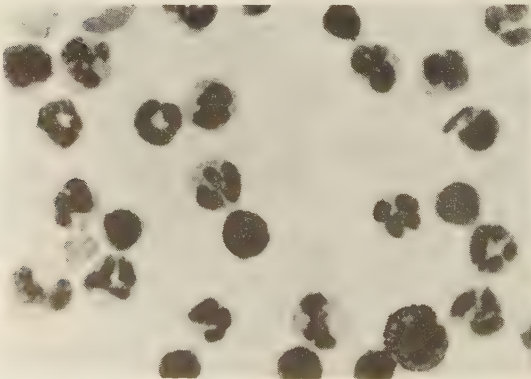


Abb. 5d: Im aufsteigenden Schenkel des Granulocytenpeaks (Gläschen 24) sehen wir eine Durchmischung der
Lymphocyten und Granulocyten im Verhältnis von
etwa 1:1. Vergrößerung: 800 : 1.

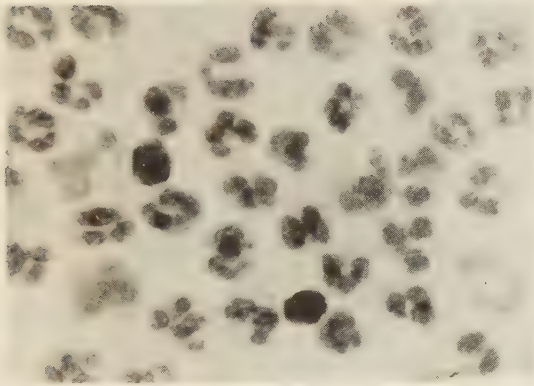


Abb. 5e: In Gläschen 25 sieht man neben wenigen Lymphocy-
ten vorwiegend Granulocyten. Vergrößerung: 800 : 1.

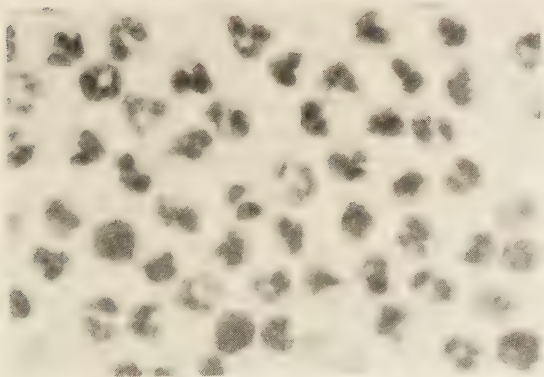


Abb. 5f: Entsprechend der Verteilungskurve haben wir in
Gläschen 26 eine hochgereinigte Granulocytenfrak-
tion vor uns. Vergrößerung: 800 : 1.

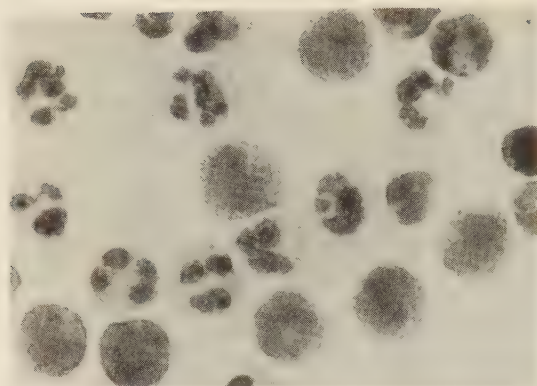


Abb. 5g: Entsprechend der Schulter im absteigenden Schenkel des Granulocytenpeaks (Gläschen 27) finden wir hier vorwiegend monocytäre Formen. (Siehe dazu auch Abschnitt E). **Vergrößerung: 800 : 1.**

In einem Parallelversuch wurde eine elektrophoretische Trennung bei genau gleichen Versuchsbedingungen mit gleichem Ausgangsmaterial wie in Versuch 5 aber in Trispuffermilieu durchgeführt, siehe dazu Abb. 6. Die einzelnen Fraktionen waren ebenfalls gut auseinandergezogen; trotz der Verwendung einer spezifisch schwereren Rohzuckerlösung war aber keine Verbesserung der Auflösung zu erreichen.

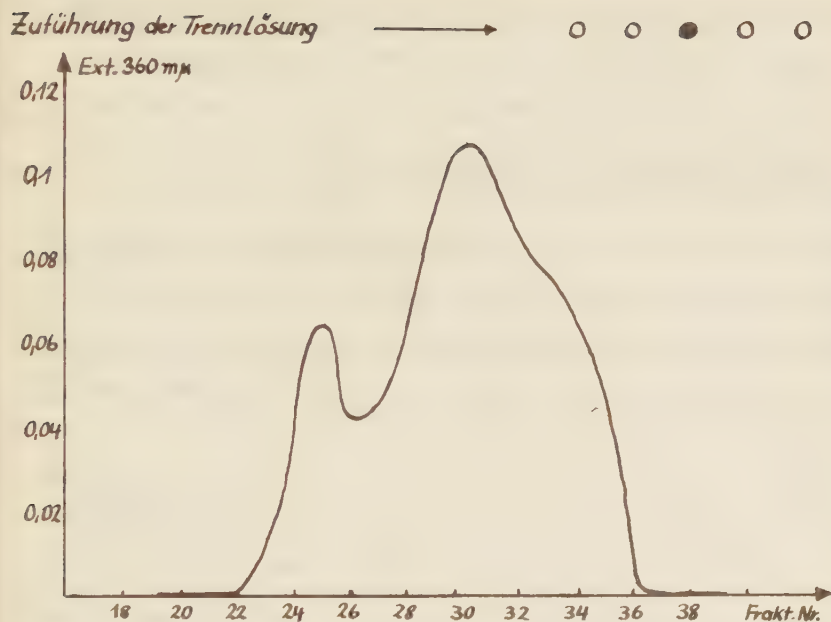


Abb. 6: Versuch zur Trennung von Blutzellen in Trispuffer.
 Trispuffer pH 7,2 (1 T. El.-Puf. + 6 T. Rohrzuckerlösung 10%)
 2 700 Volt 120 mA; 5,5°C; 100 ml/h $\hat{=}$ 65 min/45 cm; 25 Mill.
 Z./ml; Dosierung: 0,8 ml/h; $\kappa = 0,0015, \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Bei einer Versuchsdauer von 4,5 Stunden in Versuch 5 und 6 waren keinerlei Zeichen einer Agglutination der Zellen zu beobachten. Die Zugabe einer geringen Menge von EDTA zum Puffermilieu wurde deshalb mit gutem Erfolg in allen weiteren Versuchen beibehalten und scheint die Richtigkeit der Theorie von MOORE und LYANS zu bestätigen. Während bei früheren Versuchen die Zellen meistens in Haufen beieinander lagen und eine Beurteilung ihres morphologischen Zustandes beträchtliche Schwierigkeiten bereitete, ist durch

den Zusatz von EDTA deutlich eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen im Ausstrichpräparat erreicht worden.

e) Trennversuche mit Tris-Glycinpuffer.

Während in den zuvor verwendeten Medien jeweils stoffwechselfördernde Faktoren wie zum Beispiel Glucose anwesend waren, kam hier eine Pufferlösung zur Anwendung, die einen allzu schnellen Energieumsatz verhindern sollte.

Auf dem herkömmlichen Wege ermittelte ich eine isotone Tris- und Glycinlösung, die mit einer spezifischen Leitfähigkeit von $\kappa = 0,00155 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ in den empfohlenen Grenzen lag. Bei wiederholten Testläufen mit Farbstoff fiel aber auf, daß der Ablenkungswinkel α der einzelnen Fraktionen bei längerer Versuchsdauer abnahm. Es hat sich deshalb als sehr zweckmäßig erwiesen bei diesem Puffermilieu zur Aufrechterhaltung einer konstanten Ionenkonzentration den Elektrodenpuffer 1. um das etwa 10-fache stärker zu machen und 2. alle zwei Stunden zu erneuern. Diese Erscheinung war es auch, die mich bewog, von der eigentlich bevorzugteren Kombination Phosphat- Glycin, Abstand zu nehmen, da der Phosphatpuffer bei diesen extremen Bedingungen etwas inkonstantere Ionenverhältnisse aufweist.

Die mit Tris-Glycinlösung erreichten Zelltrennungen entsprachen weitgehend den Ergebnissen mit Phosphat- und Tris-

puffer, wobei es sich allerdings in einigen Phagocytoseversuchen zeigte, daß der Prozentsatz der phagocytierenden Zellen in dem neuen Milieu um etwa 15 - 20% höher lag. Das scheint doch auf starke "Ermüdungserscheinungen" der Zellen der myeloischen Reihe in glucosehaltigen Medien hinzuweisen. Bei den Lymphocyten konnten wir diese Beobachtungen nicht machen, da sie Farbstoffe wie z.B. Tusche sehr langsam und Stärkekörner überhaupt nicht phagocytieren (TREPEL et al. 1966).

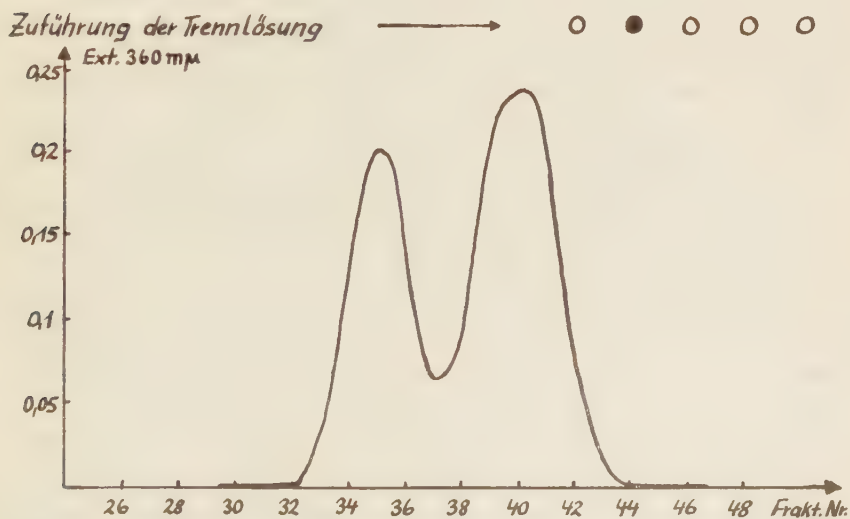


Abb. 7: Verteilungskurve eines Trennversuches nach Trübungsmessung.

Tris- Glycinpuffer $\lambda = 0,00155$; pH 7,2; 2 000 Volt, 130 mA, 4° C. Durchlaufgeschwindigkeit: 110 ml/h = 60 min/45 cm. Versuchsdauer: 4 Stunden; Konz. 30 Mill. Z./ml; Dosierung: 0,5 ml/h. Abstand der Entnahmeöffnungen: 0,5 cm.

Es gelang auch hier eine Reindarstellung von Granulocyten bei Glas 40. Dagegen fanden wir wie in allen anderen Versuchen keine scharfe Trennung zwischen Erythrocyten und Lymphocyten. Schon ab Glas 35 sahen wir eine immer stärkere Durchmischung des Erythrocyten mit Lymphocyten, die bei Glas 37 eine gewisse Anreicherung erfahren. Mit dieser Erscheinung werden wir uns weiter unten⁺⁾ noch eingehender befassen. Im Anschluß an die Granulocytenfraktion war wie in den meisten anderen Versuchen eine Zunahme monocytärer Zellen mit basophil- azurophilem Protoplasma und einem feinmaschigen, ovalen, leicht eingebuchteten Kern zu beobachten. Auf Grund der Erfahrungen mit den drei verschiedenen Pufferlösungen ist also festzustellen, daß sich zur präparativen elektrophoretischen Trennung weißer Blutzellen neben Trispuffer bevorzugt Phosphat- und eine Mischung von Tris- und Glycinpuffer, mit einem Zusatz von EDTA, in nicht zu hoher Ionenkonzentration eignet. Bei den experimentell variierbaren Versuchsbedingungen wie Stromstärke und Pufferdurchlaufgeschwindigkeit zur besseren Trennschärfe ist zugunsten der Pufferströmung zu entscheiden, d.h. die Stromstärke soll in Grenzen von 120 - 140 mA gehalten werden. Sehr große elektrische Felder haben nämlich des öfteren feine Agglutinationsstreifen an den Glaswänden verursacht, die bei entsprechend veränderter Puffergeschwindigkeit verschwanden oder garnicht erst auftraten.

⁺⁾ s. S. 48

D. Prüfung auf Vitalität der isolierten
 Lymphocyten und Granulocyten.

In der Literatur (THIMM, 1964) werden zum Nachweis der Vitalität der Leukocyten folgende Teste beschrieben:

1. Prüfung der amöboiden Beweglichkeit
2. Messung von Atmung und Stoffwechsel nach der Methode von WARBURG (1958)
3. Phagocytose
4. Färberisches Verhalten
5. Ansetzen einer Zellkultur

In unserem Fall wurden zum Nachweis der Vitalität der Granulocyten die Methode Nr. 3 und 4, für den der Lymphocyten Nr. 4 angewandt. Sie haben den Vorteil, daß sie apparativ nicht sehr aufwendig sind und doch sehr zuverlässige Ergebnisse liefern.

Die Phagocytose und das färberische Verhalten tierischer Zellen wurden bisher in der verschiedensten Weise zum Nachweis ihrer Vitalität benützt und sind von ROBINEAUX und KOSENOW (1956) zu festen Standardverfahren ausgearbeitet worden.

THIMM (1964) gelang die Entwicklung eines Schnellverfahrens, das Phagocytose und färberisches Verhalten miteinander verbindet. Danach geht man folgendermaßen vor:

Zu einer bestimmten Menge Zellsuspension gibt man eine kleine Spatelspitze sorgfältig gereinigte Weizenstärke und inkubiert eine Stunde lang bei 37° C. Bei der Beurteilung des Nativpräparates nun würde es Schwierigkeiten bereiten, Zellen und Stärkekörner voneinander zu unterscheiden; beide sind rund, weiß-durchsichtig, und eine Phagocytose von zufälligen Aneinanderlagerungen auseinanderzuhalten ist im ungefärbten Präparat nicht möglich. Zur Anfärbung der Stärkekörner bietet sich in hervorragender Weise Lugollösung an. Um über die Phagocytose hinaus noch eine Schnellmethode zum Nachweis der Vitalität zu haben, wird diese Lugollösung mit einem Farbstoff, nämlich der im Handel gebräuchlichen Schreibtinte "Quinck" der Firma Parker, im Verhältnis 4 : 1 gemischt und ein Tropfen zu dem Phagocytosepräparat auf den Objektträger gegeben. Zur Beurteilung ergeben sich vier Farbqualitäten: Die Stärkekörner werden dunkelbraun, die Zellen je nach Vitalität von der Tinte gelb (intakt), grün (geschädigt) oder blau mit violetter Kern (tot), angefärbt.

Nachstehende Abbildung zeigt ein solches Nativpräparat, hergestellt aus dem Granulocytenpeak (Gläschen 40) der Abb. 7, das mit dem Phasenkontrastverfahren beurteilt und fotografiert wurde. An den mit 1 bezeichneten Stellen sehen wir Granulocyten, die bereits phagocytiert haben. Zellen, die im Begriff stehen zu phagocytieren, wurden mit

2 gekennzeichnet. Bei 3 finden wir Granulocyten, die sich noch nicht an der Phagocytose beteiligt haben; 4 zeigt eine Zelle, die bereits Stärkekörner aufgenommen hat, aber dann zugrunde gegangen ist.

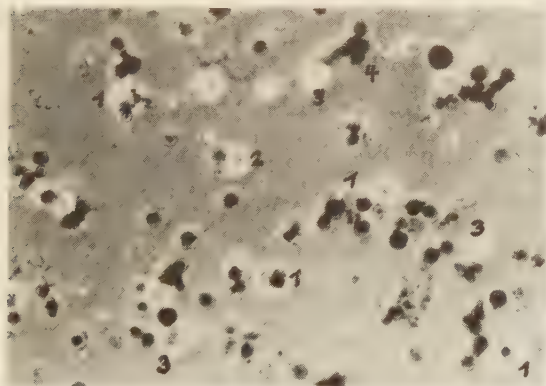


Abb. 8: Vitalitätstest einer Granulocytenfraktion.

Vergrößerung: 400 : 1. (s. experimenteller Teil)

Insgesamt gesehen, kann die Vitalität der Leukocyten, beurteilt nach ihrem färberischen Verhalten auf 85-90% festgesetzt werden. Phagocytosepräparate von verschiedenen Granulocytenfraktionen zeigten eine solche von etwa 65-70%. Der Phagocytoseversuch wurde mit Weizenstärke durchgeführt; anschließend wurden die Zellen durch das Verfahren nach THIMM (1964) auf ihre Vitalität geprüft (s. experimenteller Teil).

E. Morphologischer Zustand nach elektro-
 phoretischer Trennung.

Zur Beurteilung der Zellen nach elektrophoretischer Trennung auf Erhaltung der normalen Morphologie müssen wir zwei Kriterien ins Auge fassen, nämlich die Unversehrtheit der Membranen und die Größe der Zellen entsprechend den osmotischen Verhältnissen des umgebenden Milieus. Um dies festzustellen habe ich mich zweier Methoden bedient: Zum einen der Betrachtung der Fraktionen im Tropfenpräparat durch das Lichtmikroskop bei Phasenkontrasteinstellung, zum anderen durch das Anfertigen von Ausstrichen mit nachfolgender Färbung nach Pappenheim. Während der erste Weg recht einfach ist, durch die schwächere Vergrößerung aber auch eine wesentlich schlechtere Differenzierung zuläßt, bereitete mir die zweite Methode anfangs erhebliche Schwierigkeiten. Die Zellen, hauptsächlich die ganz empfindlichen Granulocyten waren häufig gequetscht, stark gequollen und sogar ganze Kernbruchstücke außerhalb des Plasmas konnten beobachtet werden. Nachdem in mehreren Vorversuchen eine mechanische Schädigung sowohl durch die Aufarbeitung als auch die eigentliche elektrophoretische Trennung ausgeschlossen werden konnte, ging ich an die Verfeinerung der Ausstrichmethode heran.

Mittels einer neuen Methode nach WEIDENREICH (1948) erzielte ich morphologisch intakte Zellen, am Rande des

Ausstriches manchmal etwas gequollen und durch die Osmiumfixierung mehr oder weniger gut angefärbt. Dadurch aber war der Beweis erbracht, daß die in früheren Präparaten beobachtete starke Schädigung auf mechanische Art und Weise zustande gekommen war. Eine immer wieder festzustellende Tatsache brachte mich dann auf den richtigen Weg: In insgesamt sehr schlechten Ausstrichen konnten am Rande Zellen in ausgezeichnetem morphologischem Zustand beobachtet werden. Durch folgende Überlegung läßt sich das gut erklären: Beim langsamen, etwas zu dicken Ausstreichen treten zum ersten durch das ausstreichende Deckglas und zum zweiten durch wesentliche Verschiebungen der osmotischen Verhältnisse beim Austrocknen starke morphologische Schädigungen der Zellen auf. Nach unserer heutigen Methode arbeiten wir folgendermaßen: Ein kleiner Tropfen des abzentrifugierten Sediments einer Fraktion wird schnell und dünn mit einem geschliffenen Deckglas ausgestrichen und unter mehrmaligen Hin- und Herschwenken rasch getrocknet. Die Zellen der so angefertigten und nach Pappenheim gefärbten Ausstriche zeigen, wie in den Versuchsabbildungen 5 a - g festzustellen ist, intakte Membranen und normale Größe bei gleichmäßiger Verteilung über den gesamten Bildausschnitt.

F. Bestimmung der elektrophoretischen
Beweglichkeit von Blutzellen.

Mit dem zu Anfang gemachten Hinweis auf den Ablenkungswinkel α tauchte natürlich die Frage auf, ob sich mit Hilfe der präparativen Elektrophoreseapparatur die analytischen Messungen bezüglich der elektrophoretischen Beweglichkeit der Blutzellen in etwa bestätigen ließen.

Die bis heute durchgeführten Versuche zur Bestimmung der Beweglichkeit von Blutzellen mit Hilfe der analytischen Elektrophorese ergaben bei verschiedenen Autoren sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Differenzen in den Befunden von FRITZE (1953) und BAZIN u. ROBINEAUX (1954) sowie RUHENSTROTH-BAUER (1961) sind verhältnismäßig hoch, zeigen aber eine gewisse Übereinstimmung in Bezug auf die Beweglichkeitsunterschiede der einzelnen Zellen.

Das normale Hämocytopherogramm nach RUHENSTROTH-BAUER zeigt z.B. folgende Werte:

Tabelle 2: Normales Hämocytopherogramm.

Erythrocyten	Lymphocyten	Granulocyten
1,270	1,009	0,874
$s = \pm 0,035$	$s = \pm 0,035$	$s = \pm 0,035$
$\cdot 10^{-4} (\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1})$		

Bei dem im Vergleich zur Mikroelektrophoreseapparatur soviel größeren Maßstab und den damit verbundenen erheblichen technischen Schwierigkeiten im Hinblick auf eine exakte Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit kann natürlich nur ein Näherungswert angegeben werden. Während aber in der analytischen Zellelektrophorese Streubreiten und Absolutwerte als Mittelwert aus einer Vielzahl von Messungen von Einzelzellen ermittelt werden, errechnet sich die elektrophoretische Bewegungsgröße in der kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese als statistisches Mittel aus dem Ablenkungswinkel α . Die Versuchsbedingungen, aus einer Reihe von Versuchen, ergeben nach Gleichung (1) für die Beweglichkeit der Erythrocyten

$$U = \frac{\operatorname{tg} \alpha \cdot g \cdot \kappa \cdot w}{1} = 1,3 \cdot 10^{-4} (\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}).$$

Während der Wert für die Granulocyten mit

$$U = 0,9 \cdot 10^{-4} (\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1})$$

ebenfalls gut in den Bereich der analytischen Messung hineinpaßt, weicht derselbe bei den Lymphocyten durch die relativ breite Streuung von diesem ab (s. dazu auch S.50). Insgesamt gesehen kann man aber doch von einer Bestätigung der Meßergebnisse der analytischen Zellelektrophorese durch die präparative Apparatur sprechen.

G. Bestimmung der Ausbeute.

Im Hinblick auf die nachfolgende physiologische oder physiologisch-chemische Untersuchung der verschiedenen Zellfraktionen ist es natürlich von großem Interesse etwas über die Ausbeute bei der präparativen Zellelektrophorese zu erfahren. Durch diese Untersuchungen hat es sich herausgestellt, daß die elektrophoretischen Zelltrennungen der Blutzellen neben der schonenden Arbeitsweise und der Reinheit vor allem der Granulocytenfraktionen auch eine erstaunlich gute Ausbeute an eingesetztem Material gewährleisten. Im einzelnen bin ich folgendermaßen vorgegangen:

Während einer exakt festgesetzten Zeit wurde ein Trennversuch bei ganz bestimmten Bedingungen durchgeführt. Die Zellen in der zu trennenden Suspension waren zuvor in dem automatischen Zählgerät der Firma Coulter-Counter gezählt und das Ergebnis zur Kontrolle in der Thoma-Zählkammer überprüft worden. Im Anschluß an die Trennung wurde die Zellzahl/ml in jedem einzelnen Gläschen mit Hilfe des Coulter-Counter gemessen und in absolute Zellzahlen umgerechnet.

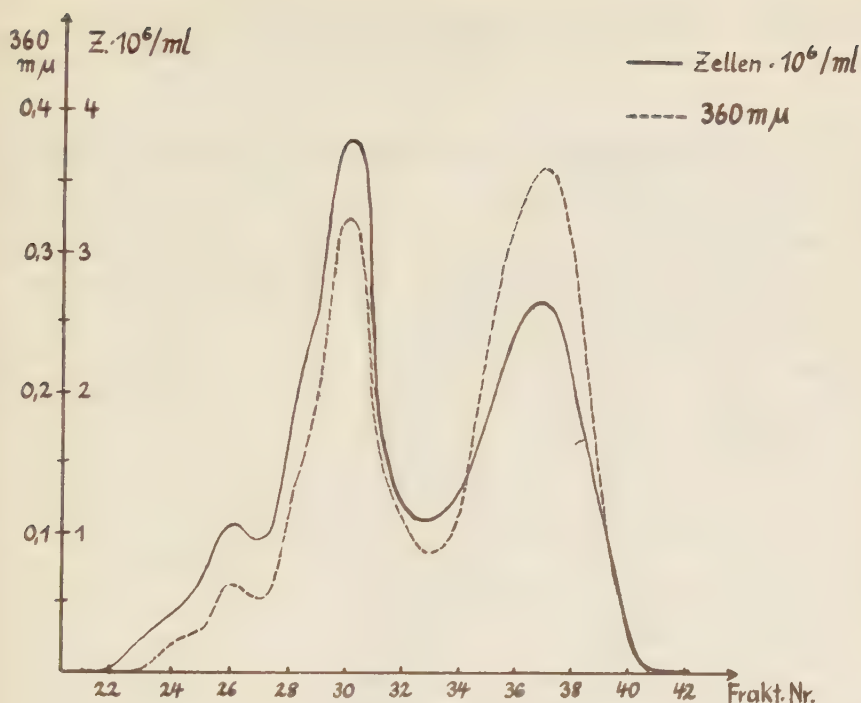


Abb. 9: Verteilungskurve nach Trübungsmessung und absolute Zellzahl pro Fraktion und ml.

Tris-Glycinpuffer pH 7,2; 2150 V; 130 mA; 2° C; Pufferdurchlaufgeschwindigkeit 100 ml/h; Versuchsdauer 3,5 Stdn.; Konzentration: 39 Mill.Z./ml; Erythrocyten : Leukocyten = 1 : 1; Dosierung 0,9 ml/h $\hat{=}$ 3,15 ml insgesamt; Abstand der Entnahmeverrichtung 0,5 cm. Coulter-Counter: Threshold 12, Faktor 6; Kapillare 100 μ , Verdünnung 1 : 500.

Legende zu Tab. 3 : Bei einer Versuchsdauer von 3,5 Stdn., einer Konzentration von 39 Mill.Z./ml und einer Dosierung von 0,9 ml/h errechnet sich das eingesetzte Material mit 123 Mill. Zellen. Mit den durch die Zelltrennung erhaltenen 89,8 Mill.Zellen ergibt sich somit eine Ausbeute von ca. 73%.

Tabelle 3: Absolute Zellzahlen der einzelnen Fraktionen.

Glas Nr.	Mittelwert/ml x 1000	ml/Glas	absolute Zellzahl Glas x 1000
Ausgangs- wert	39 000	-	-
23	251	3,2	843
24	477	3,0	1431
25	624	3,0	1873
26	1030	2,9	2967
27	1010	3,2	3272
28	1961	4,0	8046
29	2499	3,0	7498
30	3849	2,9	11142
31	2048	3,0	6144
32	1239	3,1	3862
33	1047	3,1	3265
34	1404	2,8	3893
35	1902	2,8	5285
36	2499	3,0	7497
37	2640	4,0	10762
38	1976	4,0	8105
39	1092	2,9	3147
40	287	2,9	814
Insgesamt:			89.846

(Legende s. S. 43)

H.

Experimenteller Teil.

1. Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme.

a) Trispuffer

Elektrodenpuffer: 17,5 Tris/l wird mit 2 m Citronensäure auf pH 7,3 eingestellt.

Kammerpuffer : 1 Teil Elektrodenpuffer und 5 Teile Rohrzuckerlösung 10%. Zur Vermeidung der Agglutination werden 0,93 g EDTA/l zugegeben. Bei Verdünnung mit Glucoselösung anstatt mit Rohrzuckerlösung nimmt man 53,8 g Glucose/l. Es empfiehlt sich, den Kammerpuffer für sich anzusetzen, da der pH-Wert durch die Verdünnung mit Zuckerlösung und durch EDTA erniedrigt wird.

b) Phosphatpuffer (Sörensen)

Lösung A: 9,078 g KH_2PO_4 /l

Lösung B: 11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /l

Elektrodenpuffer

von pH 7,3: 1680 ml Lösung A und 4320 ml Lösung B

Kammerpuffer-

stammlösung: 43 ml Lösung A und 458 ml Lösung B.

Verdünnung mit 10% Rohrzuckerlösung
und Zugabe von 0,93 g EDTA/l.

c) Tris-Glycinpuffer

Elektrodenpuffer: 9,3 g Na_2 EDTA/l

27 g Tris/l

Ansatz mit 2 m Citronensäure auf
pH 7,4 einstellen.

Kammerpuffer: 24 g Glycin/l

0,93 g Na_2 EDTA/l

2,7 g Tris/l

mit 0,3 m Citronensäure auf pH 7,3
einstellen.

Die spezifische Leitfähigkeit soll für alle drei Puffer-
systeme in den empfohlenen Grenzen von $\kappa = 0,001 - 0,0025$
 $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ liegen.

2. Um die Blutzellen von störendem adsorbiertem Protein
möglichst weitgehend zu befreien wurde die Anreicherung
dreimal mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, die mit 0,1 n
NaOH auf den pH 7,3 eingestellt worden war. Die Anreiche-
rungen wurden in der Christ-Zentrifuge bei 71 g etwa
15 bis 20 Min. zentrifugiert.
3. Die Ausstrichpräparate wurden mit der Methode nach
Pappenheim angefärbt.
4. Phagocytoseverfahren: Die Granulocytensuspension wird bei
37° C eine Stunde lang mit einer feinen Weizenstärkefraktion

inkubiert. Zu dem Nativpräparat auf dem Objektträger gibt man einen Tropfen Lugol-Lösung hinzu. Lugol-Lösung: 2 g KJ, 1 g J₂ und Wasser ad 100,0. Die Temperatur bei der Inkubation betrug 37°.

5. Färbemethode. Um über die Phagocytose hinaus die Zellen hinsichtlich des färberischen Verhaltens beurteilen zu können, mischt man die oben angeführte Lugol-Lösung mit der blauen Schreibtinte der Fa. Parker, Marke "Quink" im Verhältnis 4 : 1 ; die entstehende Suspension wird filtriert. Das Nativpräparat zeigt nach Zugabe eines Tropfens die bereits genannten 4 Farbqualitäten.

D i s k u s s i o n

Durch die Entwicklung der trägerfreien Ablenkungselektrophorese sind die bisherigen Methoden zur Zellfraktionierung (fraktionierte Zentrifugation und Dichtegradientenverfahren), um ein neues Trennprinzip bereichert worden, das alle bis heute angewandten Methoden in hervorragender Weise ergänzt und besonders für cytologische Probleme von großer Bedeutung zu werden verspricht. Ist es auf der einen Seite die Schwerkraft im künstlich verstärkten Schwerfeld zur Beschleunigung der Sedimentation, so ist es auf der anderen die Kraft des elektrischen Feldes, die die ganz spezifischen Ladungsträger der Zelloberflächen zur Wirkung kommen läßt. Entsprechend der Aufgabenstellung vorliegender Arbeit sollte durch Ausnützung dieser beiden grundverschiedenen physikalischen Eigenschaften der Blutzellen ihre Trennung und Reindarstellung erreicht werden.

Zur Herstellung einer Leukocytenanreicherung aus Humanblut sind mehrere in der Literatur beschriebene Methoden geprüft worden. Als bester Weg hat sich die Schrägsenkung mit makromolekularen Stoffen wie einer 3% Luviskollösung in physiologischer NaCl erwiesen. Der nach einer Stunde bei Zimmertemperatur entstandene Überstand an Blutplasma mit der "buffy-coat" wurde sorgfältigst durch eine dünne Kapillare mit Hilfe einer kleinen Schlauchpumpe abgesaugt und mit

physiologischer NaCl dreimal gewaschen, um störendes, an der Oberfläche adsorbiertes Protein weitgehendst zu entfernen. Das in der Anreicherung erzielte Verhältnis von Erythrocyten : Leukocyten bewegte sich meist in den Grenzen zwischen 3 bis 1 : 1.

Die Erfahrungen auf dem Gebiet der Puffersysteme zur Zellisolierung mittels präparativer Elektrophorese sind natürlich noch nicht sehr groß. Biologisches Material, wie in unserem Falle die Blutzellen, verlangt auf der einen Seite eine maximale Pufferwirkung bei pH 7,4 auf der anderen Seite aber eine Ionenkonzentration, die den osmotischen Druck des Blutes nicht über - oder unterschreitet. Darüber hinaus ist bei den hohen Feldstärken, wie sie in unseren Versuchen vorkommen, zur Stabilisierung der Ionenverhältnisse eine spezifische Leitfähigkeit in den Grenzen von $\kappa = 0,001 - 0,002 \text{ } (\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ unerlässlich. Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen kamen zwei Puffersysteme, nämlich Tris- und Phosphatpuffer (nach Sörensen) zur Anwendung, die sich in den Versuchen als recht brauchbar erwiesen.

Die Ermittlung isotoner Tris- und Phosphatlösungen hielt sich an die Beurteilung des morphologischen Zustandes der Zellen im Nativpräparat. Als nicht ionisierende Stoffe zur Verdünnung der Pufferstammlösungen wurden isotone Glukose- und Saccharoselösungen herangezogen. In einer

weiteren Versuchsreihe hat sich auch unter bestimmten Bedingungen eine Kombination von isotonen Tris- und Glycinlösungen als durchaus verwendungsfähig erwiesen.

Der zu Beginn unserer Versuche immer wieder beobachteten äußerst störenden Agglutination der Zellen konnte durch das Zufügen eines komplexbildenden Salzes, nämlich EDTA (Titriplex II) erfolgreich begegnet werden. Die Ergebnisse mit Tris- und Phosphatpuffer waren gut reproduzierbar, wobei wir feststellen konnten, daß die einzelnen Fraktionen im Phosphatmilieu etwas einheitlicher waren. Dennoch waren Überschneidungen in beiden Puffersystemen nicht zu vermeiden, besonders zwischen der Erythrocyten- und Lymphocytenfraktion. Diese Beobachtungen sind sicher auf den verhältnismäßig geringen elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschied zwischen beiden Zellarten, sowie auf eine, im Verhältnis zu den anderen Zellspezies relativ große Streubreite der verschiedenen Formen der Lymphocyten, zurückzuführen. Auf der anderen Seite spielt die durch das Prinzip der Ablenkungselektrophorese bedingte rasche Sedimentation der Erythrocyten eine wesentliche Rolle. Um diesen Faktor auszuschalten wurde versucht, die Sedimentation der Erythrocyten durch spezifisch schwerere Rohrzuckerlösung an Stelle von Glucoselösung zu verringern. Zur Erreichung einer besseren Trennschärfe wurde gleichzeitig die Entnahmevorrichtung der Fraktionen auf die doppelte Anzahl von Entnahme-

stellen erweitert. Durch diese Maßnahmen gelang zwar eine schärfere Fraktionierung der Granulocyten, doch konnte auch damit keine scharfe Trennung zwischen Erythrocyten und Lymphocyten erreicht werden. Auch in der Rohrzuckerlösung sedimentierten die roten Blutkörperchen verhältnismäßig rascher als die Leukocytenfraktion, wodurch bei der kontinuierlichen Elektrophorese nach dem Ablenkungsprinzip eine geringere elektrophoretische Ablenkung vorgetauscht wird. Eine methodische Verbesserung würde es bedeuten, die Kammer um 90° zu drehen, sodaß die Sedimentation in Richtung der elektrophoretischen Wanderung und nicht in Richtung der Pufferströmung erfolgt. Da diese Maßnahmen eine Umkonstruktion der komplizierten Apparatur nötig machen würden, konnten diese Versuche im Rahmen dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden.

Trennergebnisse mit biologischem Material sind nicht nur in Bezug auf Reinheit, Homogenität und hohe Ausbeute des aufgearbeiteten Materials zu beurteilen, sondern sind auch wie im Falle der Zelltrennung, mit besonderer Rücksicht auf Erhaltung der Vitalität der dargestellten Fraktionen zu untersuchen. Die mit Hilfe der Phagocytose- und der Farbstoffmethode durchgeführten Vitalitätsteste ergaben für die einzelnen Fraktionen 70-80% vitale Zellen. Was die Ausbeute an getrenntem Material anbelangt, so ermittelte ich mit Hilfe des Zählgerätes nach Coulter etwa 70-75% der eingesetzten Substanz. Auch die

morphologische Beschaffenheit der Zellen zeugt davon, daß sie durch die elektrophoretische Trennung keine Schädigung erfahren haben. Dieses Ergebnis kann als Beweis dafür angesehen werden, daß die elektrophoretische Arbeitsweise eine schonendere Methode als die bisher angewandten, darstellt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am gleichen Untersuchungsmaterial (Humanblut) spricht nicht nur für das neue Verfahren, sondern ist auch ein Beweis für die Konstanz der elektrischen Oberflächenladungen der Blutzellen gleicher Spezies.

Auf Grund der Ergebnisse in vorliegender Arbeit kann gefolgert werden, daß sich für cytologische Fragestellungen mit Hilfe der neuen Arbeitsweise, evtl. auch in Kombination mit bekannten Verfahren, neue Möglichkeiten ergeben. So wird es z.B. leichter möglich sein, einheitliche Zellpopulationen zu erhalten, die infolge der schonenden Behandlung noch alle Eigenschaften nativer Zellen aufweisen. Weiterhin wird es auch bald gelingen, bestimmte Enzymmuster einheitlichen Zellpopulationen zuzuordnen. Die Fraktionierung pathologisch veränderter Zellen ermöglicht Stoffwechseluntersuchungen im Vergleich zu normalen Zellen und kann auch Aufschlüsse über das elektrische Ladungsmuster dieser Zellen geben. In Vorversuchen konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Anreicherung Antikörper bildender Zellen möglich ist. Ihre Isolierung wird uns weiterführen auf dem Wege zur chemischen Aufklärung der Rezeptorsubstanzen.

Zusammenfassung

1. Es wird die Methode der trägerfreien Ablenkungselektrophorese beschrieben und ihre Beziehungen zur analytischen Mikroelektrophoreseapparatur erläutert.
2. Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Gewinnung einer Leukocytenanreicherung stellt sich die Methode der Schrägsenkung mittels makromolekularer Stoffe (PVP) als die beste heraus.
3. In einer Reihe von Versuchen kommen verschiedene Puffersysteme zur Trennung und Isolierung von Blutzellen aus einer Leukocytenanreicherung (Humanblut) zur Anwendung. Unter bestimmten Bedingungen lieferten dabei Tris- und Phosphatpuffer, sowie eine Kombination isotoner Tris- und Glycinlösungen gut reproduzierbare Ergebnisse.
4. Zur weitgehenden Vermeidung der Zellagglutination bewährte sich eine Zugabe von 0,93 g EDTA pro Liter Kammerpuffer.
5. Es gelang die Reindarstellung der Erythrocyten und Granulocyten, während die Lymphocytenfraktion noch geringgradig mit Erythrocyten vermischt war.
6. Die mit Hilfe der Phagocytose- und der Farbstoffmethode

durchgeführten Vitalitätsteste, sowie die morphologischen Beurteilungen ergaben für die einzelnen Fraktionen zu 70-80% vitale Zellen.

7. Die mit der Mikroelektrophoreseapparatur gemessenen Bewegungsgrößen für die einzelnen Zellpopulationen konnten durch die kontinuierliche Ablenkungselektrophorese im großen und ganzen bestätigt werden.
8. Mit Hilfe des Zellzählgerätes der Firma Coulter-Counter ermittelte ich eine Ausbeute an eingesetztem Material von etwa 70-75%.

Literaturverzeichnis

1. Bazin S. u. R. Robineaux, Compt. rend. Soc. biol.
Paris 148 I, 455 (1954)
2. Behrens M. u. F. Esch, Experientia Basel 19, 406 (1963)
3. Böhl E., J. Banke, G. Hornruth u. K. Breddin, Klin.
Wochenschrift 10, 555 (1965)
4. Cohn E.J., J.L. Tullis, M.D. Surgenor u. M.D. D'hont,
Science 114, 479 (1951)
5. Dittmer A., F.H. Dost u. H. Rind, Klin. Wochenschrift
38, 9 (1960)
6. Ege R., Biochem. Zeitschrift 130, 160 (1922)
7. Ehrhardt H. u. E. Dörfler, Blut Band X, 231 (1964)
8. Ellis R., Z. Physiol. Chemie 78, 321 (1911-12)
9. Engelhardt A., Klin. Wochenschrift 22, 1141 (1964)
10. Fischer H., Chr. Vogt u. H. Herrschaft, Klin. Wochen-
schrift 1, 10 (1963)
11. Fritze E., Pflügers Arch. Physiol. 12, 257 (1953)
12. Furchgott R. u. E. Ponder, Z. gen. Physiol., Baltimore
24, 447 (1941)
13. Grabar P., M. Seligmann u. J. Bernard, Annales de
l'Institut Pasteur 548 (1955)
14. Graßmann W. u. K. Hannig, Naturwiss. 37, 496 (1950)
15. Graßmann W. u. K. Hannig u. M. Kuedel, Deutsche med.
Wochenschrift 76, 333 (1951)

16. Graßmann W. u. K. Hannig, Z. physiol. Chemie 290,
1 (1952) und Klin. Wochenschrift 32, 838 (1954)
17. Hannig K., Habilitationsschrift (1964)
18. Klenk E. u. H. Lempfried, Z. physiol. Chemie 307,
278 (1957)
19. Klenk E. u. G. Uhlenbruck, Z. physiol. Chemie 319,
151 (1960)
20. Kosenow J.W. u. R. Robineaux, Bibliotheca haematologica
Suppl. ad Acta haematol. Band 3 u. 4, New York Basel
(1956)
21. Lindahl P.E., Biochemica et biophysica Acta 21,
411 (1956)
22. Mahlig A., Freie Elektrophorese in H.M. Rauen,
Biochem. Taschenbuch 2. Auflage Berlin, Göttingen,
Heidelberg (1964)
23. Moore H. u. M.J. Lyans, J. National Cancer Inst. 31,
1255 (1963)
24. Peach R. u. M.V. Tracey, Mod. Methoden der Pflanzen-
analyse, Band 1, 12 (1956)
25. Piper W. u. G. Ruhenstroth-Bauer, Klin. Wochenschrift
112, 11 (1956)
26. Piper W. u. G. Ruhenstroth-Bauer, Klin. Wochenschrift
34, 11 (1956)
27. Ruhenstroth-Bauer G.¹⁾, W. Kübler, G.F. Fuhrmann u. F.
Rueff, Klin. Wochenschrift 39, 764 (1961)

28. Ruhenstroth-Bauer G.²⁾, P. Sachtleben, G.F. Fuhrmann u. E. Straub, Klin. Wochenschrift 39, 839 (1961)
29. Ruhenstroth-Bauer G.³⁾, G.F. Fuhrmann u. F. Rueff, Münchner med. Wochenschrift 105, 1242 (1963)
30. Rueff F., Habilitationsschrift München 1963.
31. Sachtleben P., Cell electrophoresis 100 (1965)
32. Straub E., Cell electrophoresis 125 (1965)
33. Szilard P., Pflügers Archiv für die gesamte Physiol. 211, 597 (1926)
34. Tiselius A., Diss. Upsala 1930, Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937), Biochem. J. 31, 313 (1937), Koll. Z. 85, 129 (1938)
35. Thimm H.J., Dissertation Gießen (1964)
36. Trepel F., R. Waubke u. H. Begemann, Klin. Wochenschrift 5, 256 (1966)
37. Warburg O., K. Gawehn u. A.W. Geissler, Zeitschrift für Naturforschung, 13b, 515 (1958)
38. Weidenreich F. aus Romeis mikroskop. Technik, 1948
39. Wiedemann E., "Elektrophoresen" in Hoppe-Seyler's/Thierfelder 10. Auflage Band I, 54 (1935)

Lebenslauf

Am 22. März 1942 wurde ich als viertes Kind des Dr. med. Rudolf Ganser (gest. 1955) und dessen Ehefrau Genoveva geb. Presber in Schwenningen a.N. geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1952 in das Gymnasium in Schwenningen a.N. ein und legte hier im Frühjahr 1961 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Biologie an der Universität München und wechselte im Wintersemester 61/62 zur medizinischen Fakultät über. Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung (Sommersemester 1962) und ärztlicher Vorprüfung (Wintersemester 63/64) schloß ich im Sommer 1967 das Studium durch das Staatsexamen an der Universität München ab. Im Mai 1965 begann ich unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. K. Hannig am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit der Doktorarbeit und beendete sie im September 1966.

